

JULIANA C. PERRY

**EFEITOS DA FOSFATIDILSERINA NA MEMÓRIA
NO MODELO ANIMAL DE PARKINSON
INDUZIDO POR MPTP**

Monografia desenvolvida Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná na disciplina de Estágio em Farmacologia e apresentado ao Curso de Ciências Biológicas como exigência parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a. Dr. Maria A. B. F. Vital

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha

CURITIBA
2000

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Regina e Luiz Eduardo pelo dedicação e incentivo na minha escolha profissional.

A professora Dr^a Maria Aparecida B. F. Vital pelo incentivo inicial, dedicação e amizade que influenciou diretamente na minha formação.

Ao professor Dr. Cláudio da Cunha, pelo apoio e confiança na realização deste projeto.

Aos professores Roberto Andreatini, Miriam Elizabeth Angelucci, Roseli Lacerda, Anete Curte Ferraz pelo incentivo e apoio.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial para Silvia, Lindacir, Nair e Maria Domingas, que estiveram sempre dispostas em ajudar nas partes mais difíceis da realização deste trabalho.

Ao meu namorado Sérgio pelo companheirismo, dedicação de finais de semanas e compreensão com importância da realização deste projeto.

Aos amigos. Edmar e Monique, que estavam sempre dispostos em transmitir os conhecimentos.

As amigas. Cristina, Fernanda e Vanessa, pelas conversas nos intervalos e companheirismo nos fins de semana de trabalho.

Aos meus amigos pelo incentivo indireto, mas constante.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVO.....	11
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
III. 1 Animais.....	12
III. 2 Drogas.....	12
III. 3 Cirurgia Estereotáxica.....	12
III. 4 Delineamento Experimental.....	13
III. 5 Análise comportamental.....	14
III. 5. 1 Esquiva Ativa.....	14
III. 5. 2 Análise Estatística.....	15
IV. RESULTADOS.....	17
V. DISCUSSÃO.....	19
VI. CONCLUSÕES.....	25
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
VIII. ANEXO	

ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina

ATP: adenosina trifosfato

COMT: catecol-O-metiltransferase

DA: dopamina

DBH: dopamina β -hidroxilase

DP: Doença de Parkinson

DOPA: descarboxilase dos aminoácidos L-aromáticos

DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético

Fe²⁺: íon férrico

Fe³⁺: íon ferroso

HVA: ácido homovanílico

i.c.v.: intracerebroventricular

i.m.: intramuscular

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenoso

L-DOPA: L-3,4 dihidroxifenilalanina

MAO-B: monoamino oxidase B

MPP⁺: 1-metil-4-fenilpiridínio

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

NA: noradrenalina

PNMT: feniletanolamina-N-metiltransferase

PS: fosfatidilserina

s.c.: subcutâneo

SNC: Substância Negra parte compacta

SNC: Sistema Nervoso Central

5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)

RESUMO

A Doença de Parkinson é uma síndrome idiopática e progressiva que ocorre com maior incidência em idosos. Além dos sintomas motores, foi verificado que os pacientes parkinsonianos apresentam prejuízo na memória. A fosfatidilserina (PS) é um fosfolípido ácido de membrana capaz de melhorar as alterações cognitivas associadas às demências. Nosso grupo, já demonstrou o efeito da PS na reversão da amnésia induzida por reserpina na tarefa de esQUIVA passiva em ratos. Neste sentido, já se verificou que no modelo animal de Parkinson induzido por MPTP, os animais apresentaram prejuízo na aquisição e retenção da memória em uma tarefa de esQUIVA ativa. Assim, neste trabalho buscou-se avaliar os efeitos da PS no modelo animal de Parkinson induzido por MPTP.

Ratos Wistar machos, de 3 meses de idade foram divididos em 6 grupos: MPTP/salina (n=9); SHAM/salina (n=7); controle/salina (n=8); MPTP/PS (n=9); SHAM/PS (n=9); controle/PS (n=9). Os animais do grupo MPTP foram infundidos bilateralmente com MPTP (1µmol em 2.1µl) na Substância Negra compacta (SNc - AP: -5,0 mm; LL: ±2,1 mm e DV: -7,7 mm). O grupo SHAM foi submetido à cirurgia, entretanto não recebeu a infusão com MPTP e o controle não foi submetido à cirurgia estereotáxica. No 14º dia após a cirurgia os animais receberam salina (NaCl 0,9%) ou PS (50mg/Kg) durante 7 dias. No 21º dia os ratos passaram pela sessão treino na tarefa de esQUIVA ativa de 2 vias (30 pareamentos de tons e choque de 0,4 mA, 5 s). O teste foi realizado 24 h após o treino. Os resultados mostram o MPTP produziu um efeito amnésico em ratos submetidos à tarefa de esQUIVA ativa em comparação aos animais do grupo SHAM e controle. Além disto, a administração de PS não reverteu os efeitos do MPTP tanto no treino como no teste. Estes dados demonstram que a PS não foi capaz de atenuar as alterações cognitivas neste modelo animal.

I - INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é uma síndrome idiopática e progressiva, associada a degeneração de vários sistemas neuronais (GERLACH & RIEDERER, 1996; STOOF *et al.*, 1999), como o dopaminérgico, colinérgico e serotoninérgico.

Esta doença foi descrita em 1817 pelo médico inglês James Parkinson no "*Essay on the Shaking Palsy*" (GERLACH & RIEDERER, 1996). A incidência e a taxa de prevalência da DP sobre as demais doenças tende a aumentar com a idade, representando por volta de 2/3 dos pacientes que procuram tratamento para distúrbios de movimento (TEIVE & MENESES, 1996). Dados epidemiológicos demonstram que aproximadamente 0,15% da população em geral e 0,5% de indivíduos com idade superior a 50 anos são afetados pela DP (STOOF *et al.*, 1999).

A fisiopatologia da DP está associada a degeneração de neurônios dopaminérgicos dos Gânglios da Base, principalmente da Substância Negra e do corpo estriado como os núcleos caudado e putâmen (GERLACH & RIEDERER, 1996).

As células lesadas na DP podem ser caracterizadas histologicamente pela presença de inclusões eosinófilas intracitoplasmáticas constituídas por várias estruturas de natureza protéica, denominadas corpos de Lewy. Estas inclusões podem ser encontradas em alguns idosos, entretanto, entre 85-100% das autópsias realizadas em pacientes com DP observou-se a presença dos corpos de Lewy nos neurônios dopaminérgicos (GIBB, 1989). A presença dos corpos de Lewy evidencia áreas de degeneração celular, portanto, podem ser considerados como marcadores da perda neuronal em regiões específicas do sistema nervoso (TEIVE & MENESES, 1996).

A Substância Negra é formada por corpos celulares de neurônios dopaminérgicos que contêm neuromelanina. A degeneração da neuromelanina contendo tirosina hidroxilase (enzima associada à síntese das catecolaminas) e o depósito de

corpos de Lewy, resultam na redução de dopamina (DA) no Sistema Nervoso Central – SNC (HANGAN *et al.*, 1997; RIEKKINEN *et al.*, 1999).

A DA é uma catecolamina que tem como precursor, a tirosina, que é convertida em DOPA através da tirosina hidroxilase. Em uma segunda etapa a DOPA é transformada em DA pela DOPA descarboxilase. A DA pode ser convertida em noradrenalina (NA) e adrenalina, pela ação das enzimas dopamina β - hidroxilase (DBH) e feniletanolamina-N-metiltransferase (PNMT), respectivamente. O principal mecanismo de inativação da DA é a recaptação na fenda sináptica ou através da degradação enzimática pela MAO encontrado na membrana mitocondrial intraneural e pela COMT localizada na fenda sináptica. Os principais metabólitos são o ácido diidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA). O primeiro é formado pela desaminação oxidativa (MAO) seguida por oxidação enzimática do aldeído resultante, que é um derivado metoxi do DOPAC. O HVA é formado pela ação da COMT e é freqüentemente usado como indicador do turnover de dopamina.

Nos pacientes parkinsonianos, além do decréscimo de DA na via nigroestriatal (LINDNER *et al.*, 1999), pode ocorrer também redução de NA nos neurônios do *Locus Coeruleus* (STOOF *et al.*, 1999), perda de serotonina (5-HT) no *Núcleo da Rafe* e redução de acetilcolina (ACh) no *Nucleus basalis de Meynert*.

Os sintomas mais comuns encontrados em pacientes com DP são tremor, rigidez muscular, acinesia (ausência generalizada dos movimentos) e deficiência cognitiva (LINDNER *et al.*, 1999; RIEKKINEN *et al.*, 1999). Outro sintoma característico da doença é a bradicinesia que consiste em lentidão e pobreza de movimentos (TACHIBANA *et al.*, 1999). A acinesia e bradicinesia estão associados a degeneração de neurotransmissores dopaminérgicos na Substância Negra e a conseqüente deficiência da DA estriatal (GERLACH & RIEDERER, 1996).

Os principais sinais que caracterizam a DP são a perda de expressividade facial, a marcha “*petit pas*”, “*freezing*”, fala monótona, hipofônica e disártrica, micrografia (alteração na escrita) e redução do sono. Nestes pacientes podem ainda ocorrer alterações autonômicas como hipersalivação, diminuição da deglutição, alteração do peristaltismo intestinal, diminuição da atividade sexual, tontura e perturbações sensitivas. A demência é também uma característica da DP, encontrada em 15-20% dos pacientes (DUBOIS & PILLON, 1997). Além disto, observa-se quadros de depressão e ansiedade nesta síndrome (VALLDEORIOLA *et al.*, 1997). Estes estão associados com o estágio da doença e com a deficiência cognitiva (AARSLAND *et al.*, 1999), descrito através de testes com pacientes parkinsonianos.

A deterioração do processo de aprendizado e memória associado à idade é característico em mamíferos (FRICK *et al.*, 1999). Já é conhecido que alguns tipos de memória são afetados com avanço da idade em humanos, entretanto, várias funções da memória são prejudicadas na DP (DUBOIS & PILLON, 1997).

Existem dois tipos de memória, a de curta duração e a de longa duração. A memória de curta duração, consiste na capacidade do indivíduo em reter uma determinada informação por vários segundos, enquanto a operação mental está sendo realizada. Enquanto, a memória a longo prazo ou de referência, está associada ao armazenamento de informações por um período maior de tempo. Esta pode ser dividida em memória explícita, denominada também de declarativa, na qual o indivíduo possui a habilidade de lembrar conscientemente das informações. E memória implícita do tipo procedural que está relacionada com fatores involuntários e inconscientes. Tanto a memória operacional como a de longo prazo podem estar alteradas nos pacientes com DP (DUBOIS & PILLON, 1997).

Segundo, VALLDEORIOLA *et al.* (1997), as alterações cognitivas encontradas nos pacientes com DP envolvem lentidão no processamento de informações e prejuízo na aquisição das memórias de curto prazo. A memória operacional está diretamente associada ao sistema dopaminérgico. A redução da atividade dopaminérgica no estriado e no lobo frontal na DP pode provocar um prejuízo na memória operacional, dificultando o processo da memória declarativa que requer estratégias operacionais (STEBBINS *et al.*, 1998).

Os possíveis mecanismos etiopatogênicos da DP podem estar associados a produção de radicais livres, ao envelhecimento cerebral, a predisposição genética, as anormalidades mitocondriais ou a exposição repetida de neurotoxinas ambientais como algumas toxinas agroindustriais.

Atualmente o “*estresse oxidativo*” é hipótese mais aceita para explicar a DP. A produção de radicais livres resultantes do metabolismo dopaminérgico provocaria um desequilíbrio neuronal, o estresse oxidativo, reduzindo a formação de DA. A produção dos radicais livres podem induzir lesão e morte celular. Em equilíbrio normal estes eventos são neutralizados por agentes redutores e enzimas neuroprotetoras (TEIVE & MENESES, 1996).

Durante o período de 1979 a 1982, observou-se na Califórnia (Estados Unidos), que um número de jovens dependentes de drogas, desenvolveram uma séria e irreversível síndrome Parkinsoniana, após injetarem um novo tipo de heroína sintética. Estes pacientes exibiram todos os sintomas típicos da DP e responderam bem ao tratamento com L-DOPA e agonistas dos receptores de dopamina. Uma análise da heroína sintética mostrou que ela estava contaminada com 25% de 1-metil-4 fenil-4-propionoxipiperidina e também, 2,9% de 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina - MPTP (LANGSTON *et al.*, 1983). O potencial desta substância em produzir uma síndrome de Parkinson foi

subseqüentemente confirmado em várias espécies de animais (ZIGMOND & STRICKER, 1989; GERLACH et al., 1996). Investigações bioquímicas e histológicas demonstraram que a síndrome Parkinsoniana induzida por MPTP coincide exatamente com a DP no homem, apresentando todos os principais traços desta (GERLACH et al., 1996).

Dentre os modelos animais utilizados para induzir a DP, destaca-se o do MPTP (GERLACH *et al.*, 1996). O MPTP tem características lipofílicas e, após atravessar a barreira hematoencefálica, destrói seletivamente neurônios dopaminérgicos do SNC, induzindo alterações patológicas e bioquímicas semelhantes ao quadro clínico da DP (LANGSTON *et al.*, 1984).

Estudos sobre o mecanismo de ação do MPTP têm mostrado que a toxina deve ser convertida ao radical livre MPP^+ (1-metil-4-fenilpiridínio) através da metabolização pela monoamino-oxidase-B (MAO-B). O MPP^+ é seletivamente captado pelos sítios de captação de alta afinidade nos terminais dopaminérgicos e noradrenérgicos e acumula-se em concentrações milimolares dentro das mitocôndrias do neurônio dopaminérgico. O processo de formação de MPP^+ e o acúmulo do mesmo estão associados a neurotoxicidade dopaminérgica (KALARIA *et al.*, 1987; WONG *et al.*, 1999). O MPP^+ concentra-se na mitocôndria inibindo a ação da NADH CoQ₁ redutase, enzima específica do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. A interrupção da fosforilação oxidativa resulta em diminuição dos níveis de adenosina trifosfato (ATP) (GERLACH & RIEDERER, 1996; HANGAN *et al.*, 1997; WONG *et al.*, 1999). Uma consequência é a despolarização neuronal parcial e ativação secundária de receptores NMDA voltagem-dependentes, os quais podem produzir, quando da ativação excessiva, excitotoxicidade e morte neuronal. A morte neuronal pode ocorrer devido a uma

incapacidade dos neurônios de manter a homeostase do cálcio em função da deficiência de energia.

A toxicidade do MPP⁺ pode estar associada ao “*estresse oxidativo*” com o aumento da produção de radicais livres e superóxidos durante o metabolismo do MPTP (GERLACH & RIEDERER, 1996; HANGAN *et al.*, 1997; WONG *et al.*, 1999). Este processo acarretaria na diminuição de agentes antioxidantes como o glutathion reduzido (GSH) e a vitamina C, facilitando o acúmulo de radicais OH, Fe²⁺ e Fe³⁺ (HANGAN *et al.*, 1997).

Embora a administração sistêmica de MPTP não acarrete em anormalidades na região nigroestriatal em ratos, a infusão direta de MPTP na Substância Negra destrói a zona compacta dos neurônios dopaminérgicos e depleta a dopamina estriatal e seus metabólitos (KALARIA *et al.*, 1987). Além disto, a administração de MPTP na Substância Negra parte compacta (SNc) foi comprovada como um modelo animal de Parkinson válido para avaliar o prejuízo na aquisição e retenção da memória (MIYOSHI, 1999).

O tratamento mais comum para os pacientes com DP é utilizando o precursor da DA, a L-3.4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA), pois a DA é degradada antes de chegar ao cérebro. A L-DOPA é uma droga importante para o tratamento da DP, porém, com o uso freqüente pode desenvolver complicação motoras e discinesias (GRONDIN *et al.*, 1999). Estas discinesias são decorrentes da supersensibilidade dopaminérgica induzida pelo tratamento prolongado com L-DOPA. Neste sentido, GOMEZ-MANCILLA & BÉDARD (1991) observaram que os efeitos colaterais da L-DOPA podem ser reduzidos com a administração do 17β- estradiol antes ou durante o tratamento com L-DOPA em fêmeas de *Macaca fascicularis* castradas que receberam MPTP (i.v.). De acordo com estes autores o 17β- estradiol reduz a afinidade dos agonistas de receptores

D₂, portanto o efeito produzido por este composto poderia estar associado a uma redução da afinidade dos receptores D₂ dopaminérgicos na região lateral e na cauda do estriado.

Por outro lado, outros sistemas de neurotransmissores foram estudados e verificou-se que um antagonista α -adrenérgico, o idazoxan, foi capaz de influenciar a atividade locomotora em macacos expostos ao MPTP. O efeito antiparkinsoniano do idazoxan pode reduzir discinesias causadas pelo tratamento com L-DOPA. Este trabalho também sugere que manipulações farmacológicas no sistema noradrenérgico pode beneficiar os pacientes com Parkinson (GRONDIN *et al.*, 1999).

Atualmente o tratamento da DP tem-se voltado ao desenvolvimento de drogas que reduzam os sintomas motores dos pacientes, dando-se pouca ênfase para os distúrbios cognitivos decorrentes desta doença. Neste sentido, dentre as drogas nootrópicas existentes no mercado, destaca-se a fosfatidilserina (PS) no tratamento de amnésia associada às demências.

A PS é um fosfolípido extraído e purificado da região do córtex de bovinos, conhecido pelos diversos efeitos no SNC (FAGIOLI *et al.*, 1989; NUNZI *et al.*, 1989). Os fosfolípidios presentes nas membranas não estão relacionados somente com os componentes estruturais, mas também envolvidos direta e ativamente com a transdução da informação através das membranas. Tem-se demonstrado que este composto apresenta um importante papel em diversas ligações de membrana semelhante a ativação enzimática, a fusão de lipossomos e a permeabilidade de íons (SAMSON, 1987).

O mecanismo de ação deste fosfolípido está relacionado à alterações tanto em sistemas de neurotransmissores quanto ao aumento da atividade de enzimas como a Na⁺ K⁺ ATPase (CALDERINI *et al.*, 1985). Com relação aos neurotransmissores já foi demonstrado que a administração de PS foi capaz de restaurar os níveis de acetilcolina –

ACh (MANTOVANI *et al.*, 1982; PEDATA *et al.*, 1985), DA, NA e 5-HT. Além disto, esta droga pode atuar indiretamente aumentando o turnover da NA e DA em diversas áreas cerebrais, sendo que este processo é acompanhado pela ativação da adenil-ciclase (MANTOVANI *et al.*, 1982).

A PS é um precursor da fosfatidilcolina, responsável pela formação da colina (AMMASSARI-TEULE *et al.*, 1989). A colina mais a acetil-CoA sofrem ação da enzima de síntese colina acetil transferase (CAT), onde ocorre uma acetilação da colina com acetil CoA, formando ACh que é acondicionada em vesículas sinápticas.

Os efeitos da PS no aprendizado e memória são bem conhecidos, e alguns autores tem demonstrado os efeitos do PS em estudos comportamentais e neuroquímicos que estão relacionados à função cognitiva.

CLARO e colaboradores (1999) verificaram que o tratamento com PS (50 mg/Kg / 5 dias) atenuou a amnésia induzida por escopolamina em camundongos no modelo de esQUIVA discriminativa em um labirinto de cruz elevado. Além disto, este estudo corrobora a hipótese de que a PS está associada ao circuito colinérgico, sem descartar a participação de outros mecanismos. Outros autores (MANTOVANI *et al.*, 1982) demonstraram que a PS exerce um antagonismo sobre os efeitos da escopolamina em ratos e coelhos avaliados em um estudo eletrocortical. A PS influencia o sistema colinérgico cortical comprovado por um aumento na produção de ACh no córtex. Esses autores verificaram que mesmo com a administração PS em doses baixas já foi possível observar uma redução dos efeitos da escopolamina, e no tratamento crônico a PS aumentou os níveis de ACh estriatais.

Alguns autores (ZANOTTI, *et al.*, 1989; MAGGIONI *et al.*, 1990; COHEN *et al.*, 1992) tem demonstrado que a administração crônica de PS provoca uma melhora nos processos de aprendizagem e memória. Neste sentido, ZANOTTI e cols (1989),

verificaram que ratos idosos tratados prolongadamente com PS (50 mg/dia/durante 7-12 semanas) obtiveram uma melhor performance no labirinto aquático de Morris e na esQUIVA passiva. Este trabalho, mostrou que a PS foi capaz de restaurar as funções colinérgicas dos ratos idosos, sem descartar a hipótese que esta droga estaria atuando sobre outros sistemas neuronais. Além disto, DRAGO e cols em 1981, avaliaram em ratos idosos o efeito da administração de PS tanto i.p. como intracerebroventricular (i.c.v.) em uma tarefa de esQUIVA ativa. Os resultados obtidos mostraram que a PS foi capaz de melhorar a memória em ratos velhos e sugerem que a PS esteja envolvida com o processo de aquisição da memória.

Existem ainda estudos avaliando o efeito da PS durante o desenvolvimento perinatal. FAGIOLI e colaboradores em 1989, trataram camundongos C57BL/6 fêmeas prenhas que a partir do nascimento dos filhotes passaram a receber uma suspensão de PS ou água durante trinta dias. Os animais que receberam a PS no período de lactação apresentaram uma melhor retenção na esQUIVA passiva, sugerindo que este composto pode atuar no comportamento adulto quando administrada durante o desenvolvimento do SNC. Neste sentido, AMMASSARI-TEULE e cols (1989), avaliaram camundongos C57BL/6 que receberam PS desde o período de desenvolvimento pós natal até completarem 2 meses de idade em um labirinto radial. Verificou-se que os animais tratados com PS apresentaram uma melhora na memória espacial comparando com o grupo controle. Estes resultados mostram que além do efeito da PS no processo neurodegenerativo, esta droga ainda atua durante o desenvolvimento cerebral.

Nosso grupo, já verificou que tanto a administração aguda (pré ou pós-treino) como o tratamento prolongado com PS foi eficaz na reversão da amnésia induzida por reserpina na esQUIVA passiva. Neste modelo, foi demonstrado que a reserpina é capaz de produzir amnésia transitória quando administrada imediatamente após a sessão treino na

esquiva passiva. Este efeito amnésico foi observado nos testes realizados 24 h e 1 semana após o treino, mas não foi verificado no teste realizado 2 semanas após a administração de reserpina (ALVES *et al.*, 2000).

Diante do exposto, verifica-se que apesar dos avanços das neurociências, a DP é, até o momento, uma patologia irreversível, cujo tratamento é apenas paliativo. Atualmente, os sintomas motores são mais facilmente tratados, enquanto os sintomas cognitivos são ainda pouco estudados. Deste modo, drogas que possam ser úteis na reversão das funções cognitivas podem auxiliar na melhoria da qualidade de vida dos pacientes parkinsonianos.

Assim observa-se a necessidade de avaliar drogas nootrópicas como a PS no modelo animal de Doença de Parkinson induzido por MPTP.

II- OBJETIVO

Investigar os efeitos da administração de fosfatidilserina no modelo animal de Doença de Parkinson induzido pelo MPTP no processo de aquisição e retenção da memória em roedores.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 Animais:

Foram utilizados setenta e seis ratos Wistar machos, de 3 meses de idade, da mesma linhagem, obtidos através de cruzamentos sucessivos de matrizes provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná .

Os animais foram mantidos em uma sala com umidade e temperatura controladas ($22 \pm 1^\circ \text{C}$), em um ciclo de claro-escuro de 12 horas (7:00-19:00 h). Água e comida foram fornecidas à vontade aos animais durante todo o experimento.

III.2 Drogas:

- MPTP (2,1 μl) - Sigma
- Fosfatidilserina - PS (50 mg/Kg) – TRB pharma
- Solução de NaCl 0,9 % (1ml/Kg);

III. 3 Cirurgia Estereotáxica

Os animais submetidos à cirurgia receberam o anestésico tiopental 40mg/Kg (i.p.). Em seguida foi administrado: 0,1 ml penicilina G- Procaina 200.000 U/ml (i.m.) e sulfato de atropina 0,4 mg/Kg (i.p.). Antes de posicionar os animais no estereotáxico

injetou-se um anestésico local (lidocaina 0,15 ml) na derme da região craniana dos ratos.

Os animais do grupo MPTP receberam 2,1 µl de MPTP (µmol) através de uma agulha de 30 gauge com uma vazão de 0,35 µl/minuto nas seguintes coordenadas estereotáxicas: barra nasal: - 3,3 mm da barra interaural; ântero-posterior: - 0,5 mm do bregma; latero-lateral: ± 2.1 mm da linha mediana e dorso-ventral: -7,7 mm do crânio.

O grupo SHAM foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico. Entretanto, os animais não receberam o MPTP, sendo somente introduzida a agulha nas mesmas coordenadas estereotáxicas. Os ratos do grupo CONTROLE não foram submetidos à cirurgia estereotáxica, mas foram retirados da gaiola de moradia para manuseio durante alguns minutos. Este procedimento foi realizado para minimizar as diferenças entre o grupo CONTROLE e os grupos SHAM e MPTP que sofreram o estresse cirúrgico.

III.4 Delineamento Experimental:

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos. Todos os animais receberam salina (1ml/Kg) ou PS (50mg/Kg) quatorze dias após a cirurgia estereotáxica. A administração foi realizada uma vez ao dia por um período de 7 dias. No 21º dia os ratos passaram pela sessão treino na tarefa de esquiva ativa de 2 vias (30 pareamentos de tons e choque de 0,4 mA, 5 s). O teste foi realizado 24 h após o treino, nas mesmas condições.

Entre o período pós cirúrgico e o início do treino da tarefa de esquiva ativa ocorreu a morte de alguns animais decorrente da lesão feita pelo MPTP ou do estresse cirúrgico. Os animais do grupo SHAM apresentaram mortalidade de 15%, enquanto no

grupo MPTP a mortalidade alcançou 50%. Os animais restantes foram divididos segundo o esquema de tratamento abaixo:

1. **MPTP + SALINA** (n = 9)

2. **SHAM + SALINA** (n = 7)

3. **CONTROLE + SALINA** (n = 8)

4. **MPTP + PS** (n = 9)

5. **SHAM + PS** (n = 9)

6. **CONTROLE + PS** (n = 9)

III.5 Análise Comportamental

III-5.1 Esquiva Ativa

Vinte e um dias após a cirurgia, os animais foram treinados na tarefa de esquiva ativa de duas vias. Nesta análise comportamental, os animais foram treinados em uma caixa automatizada (GEMINI Avoidance System, vide Figura 1) contendo dois compartimentos claros. O piso da caixa é formado por barras de cobre com espessura de 1mm e espaçados de 10 em 10 mm. A comunicação entre os dois compartimentos foi feita por uma porta guilhotina que era mantida aberta durante todo o experimento.

Na sessão treino os animais foram alojados na caixa de condicionamento e, após um período de habituação de 180 s seguiram 30 pareamentos de campainha (1,5 KHz, 60 db, 5 s) com um choque nas patas do animal (0,4 mA com varredura de 60 hz) durante 5 s ou até a passagem do animal para o outro compartimento da caixa. Ao final

dos pareamentos os animais foram retirados da caixa automatizada retornando a gaiola de moradia.

A sessão de teste, foi realizada 24 horas após a sessão de treino. Esta sessão consistiu no mesmo procedimento anterior, exceto no tempo de habituação que foi reduzido para 120 s. Durante as sessões de treino e teste o número de esquivas (cruzamento enquanto soava a campainha) e o tempo de fuga (contabilizado a partir do início do campainha) foram armazenados de maneira automática, por um computador acoplado ao sistema.

III.4.1 Análise Estatística:

Os dados do número de esquivas e o cruzamento inter provas foram analisados pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Duncan. A comparação entre o treino e o teste na esQUIVA ativa de duas vias foi analisado pelo teste de “t” de Student. O nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$.

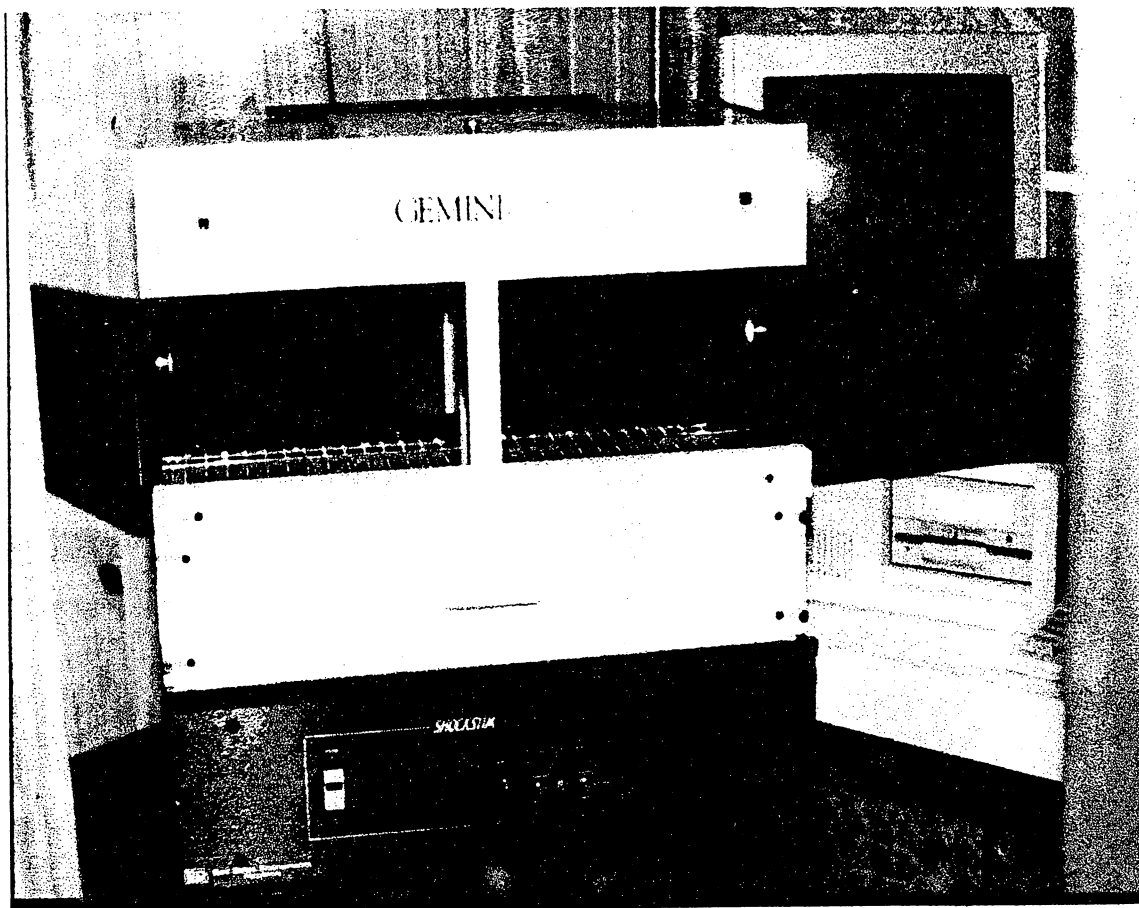


Figura 1. Caixa automatizada GEMINI Avoidance System, utilizada para avaliar os animais na tarefa de esquiva ativa de duas vias.

IV- RESULTADOS

Na tarefa de esquiva ativa de duas vias, os grupos que receberam a infusão com MPTP apresentaram redução estatisticamente significativa em relação aos números de esquivas comparado aos grupos SHAM e CONTROLE tanto na sessão de treino ($F(2,45)= 6,53$; $p \leq 0,05$ ANOVA de uma via; $p \leq 0,05$ teste de Duncan) como na sessão teste ($F(2,45)= 11,29$; $p \leq 0,001$ ANOVA de uma via; $p \leq 0,05$ teste de Duncan). Entretanto, a diferença entre os animais tratados com PS ou salina no número de esquivas na sessão treino e teste não foi estatisticamente significativa, tal como pode ser observado na Figura 2.

NÚMERO DE ESQUIVAS

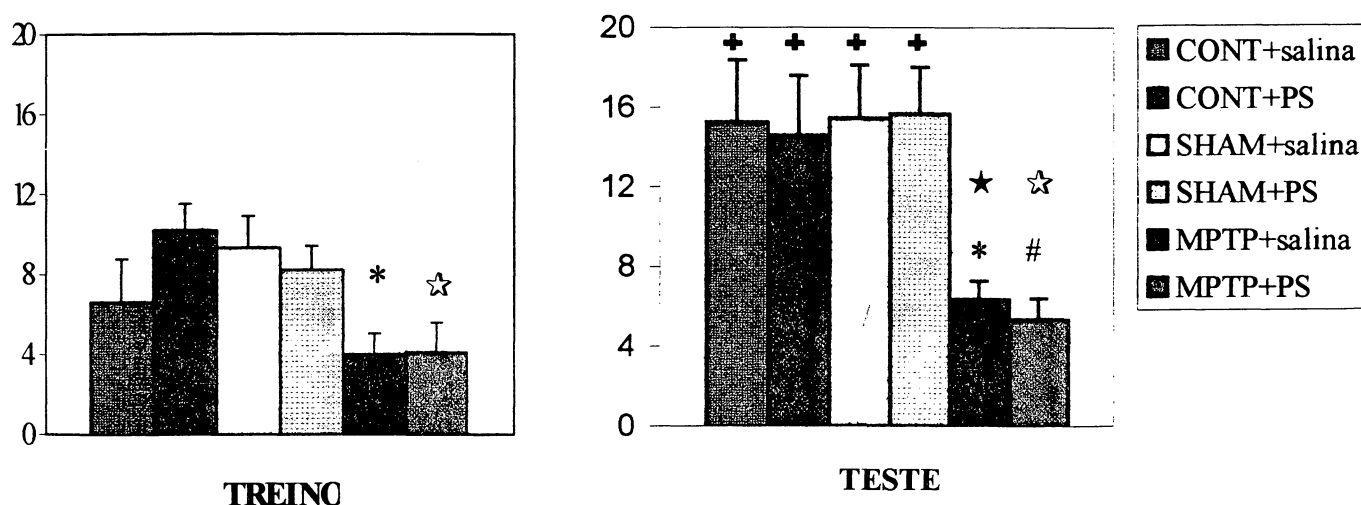


Figura 2. Efeitos da administração repetida (7dias) de PS no número de esquivas da sessão treino e teste de ratos após a administração de MPTP na SNc. Os valores estão representados pelas médias \pm EPM. ANOVA seguido do teste de Duncan. ★ $p \leq 0,05$ comparado com o grupo controle+salina; ☆ $p \leq 0,05$ comparado com o grupo controle+PS; * $p \leq 0,05$ comparado com o SHAM+salina; # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo SHAM+PS. + $p \leq 0,05$ comparado com os números totais de esquivas do treino (teste “t” de Student).

Em relação ao parâmetro cruzamento inter provas (CIP) da esQUIVA ativa de duas vias, foi verificado que todos os grupos, independente do tratamento, não apresentaram diferença estatisticamente significativa, tal como pode ser visto na Figura 3.

CRUZAMENTO INTER PROVAS

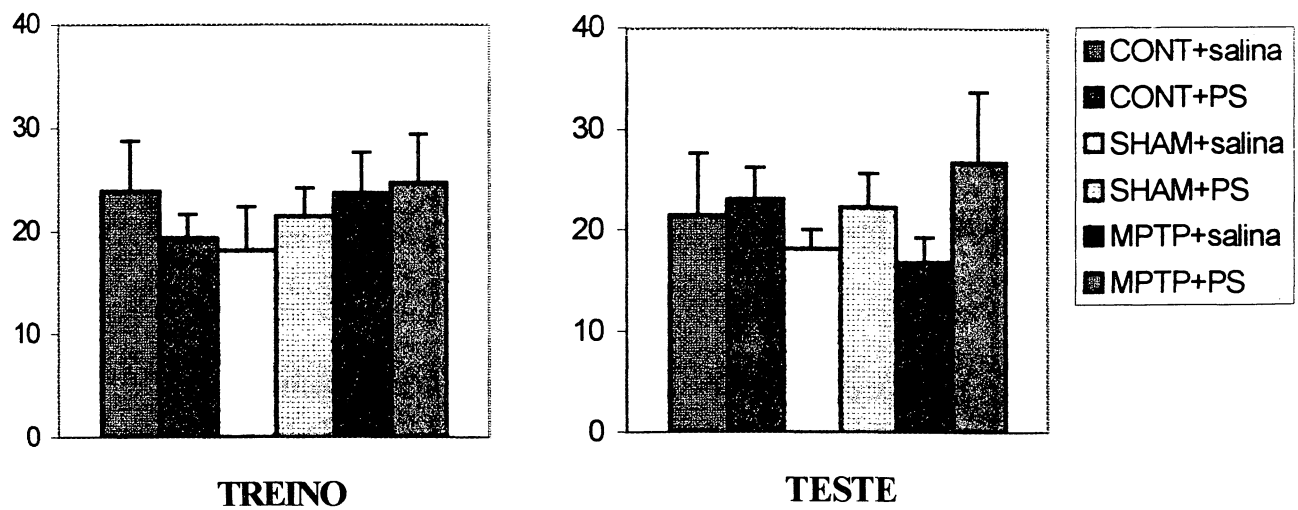


Figura 3. Efeitos da administração repetida (7dias) de PS no cruzamento inter provas da sessão treino e teste de ratos após a administração de MPTP na SNc. Os valores estão representados pelas médias \pm EPM. ANOVA seguido do teste de Duncan.

V - DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que a administração de MPTP na SNc produziu efeito amnésico em ratos submetidos à tarefa de esquiva ativa em comparação aos animais do grupo SHAM e controle. Este fato corrobora dados anteriores do nosso grupo (MIYOSHI, 1999) de que os animais com destruição dos neurônios dopaminérgicos da SNc apresentam prejuízo cognitivo, entretanto não mostram alterações motoras como esperado na DP. Neste sentido, diversos autores (SCHNEIDER & POPE-COLEMAN, 1995; FAGLIONI *et al.*, 1997; DUBOIS & PILLON, 1997) já demonstraram que as alterações cognitivas precedem a sintomatologia motora parkinsoniana.

Como mencionado anteriormente, dados de literatura indicam que 50% dos casos de DP têm piora significativa das funções cognitivas, sendo que um em cada cinco pacientes poderão apresentar um quadro de demência (KORCZYN *et al.*, 1995; BRAAK *et al.*, 1996). Estes fatos ressaltam a importância da realização de estudos sobre os mecanismos degenerativos da DP e a busca de tratamentos eficazes, sobretudo com relação à preservação da função cognitiva.

Neste trabalho buscou-se ainda investigar os efeitos da PS em animais tratados com o MPTP. Nossos resultados indicam que, contrariamente ao esperado, a PS não foi eficaz na reversão da amnésia produzida pela administração de MPTP. Além disto, não foram encontradas diferenças significantes entre os animais dos grupos SHAM e controle que receberam PS e aqueles que receberam salina. Por outro lado, nosso grupo já observou que tanto a administração aguda (pré ou pós-treino) como o tratamento prolongado com PS foi eficaz na reversão da amnésia induzida por reserpina na esquiva passiva (ALVES *et al.*, 2000).

Assim, três hipóteses não excludentes podem ser sugeridas para explicar a ausência de efeitos da PS no modelo animal de Parkinson induzido pelo MPTP.

A primeira hipótese está relacionada com os diferentes modelos de Parkinson acima citados. No modelo da reserpina, proposto por CARLSSON *et al.* (1958), observou-se que a administração desta droga reduz a atividade motora causando acinesia, hipocinesia, tremores e catalepsia em ratos, bem como a reversão destes sinais após a administração de L-DOPA.

O mecanismo farmacológico da reserpina indica que o alcalóide afeta o mecanismo intraneuronal de armazenamento de neurotransmissores nas vesículas, bloqueando a enzima magnésio-ATPase. Assim são depletadas vesículas de dopamina e outros neurotransmissores, tais como, adrenalina, histamina, NA e 5-HT (GERLACH & RIEDERER, 1996). Deste modo, nos anos sessenta e setenta, a inibição da atividade motora induzida por reserpina em roedores foi amplamente usada para investigar drogas eficazes na DP (MENZAGHI *et al.*, 1997). Neste modelo, demonstrou que a reserpina foi capaz de produzir amnésia transitória quando administrada imediatamente após a sessão treino na esquiwa passiva. Este efeito amnésico foi observado nos testes realizados 24 h e 1 semana após o treino, mas não foi verificado no teste realizado 2 semanas após a administração de reserpina (ALVES *et al.*, 2000). Este fato, mostra que a depleção de catecolaminas é um efeito reversível, indicando que apesar das similaridades comportamentais observadas nos animais, a reserpina pode ser criticada como um modelo animal de DP. Animais tratados com reserpina apresentam uma depleção de 64% dos níveis de dopamina estriatal após tratamento prolongado com o alcalóide (NEISEWANDER *et al.*, 1991), entretanto, como dito anteriormente, a dopamina não é único neurotransmissor depletado pela reserpina.

Neste trabalho, avaliamos os efeitos amnésicos do MPTP, o qual é atualmente considerado como o melhor modelo experimental para estudo da DP (GERLACH *et al.*, 1996). A toxicidade do MPP⁺ pode estar associada ao “*estresse oxidativo*” com aumento da produção de radicais livres e superóxidos durante o metabolismo do MPTP (GERLACH & RIEDERER, 1996; HANGAN *et al.*, 1997; WONG *et al.*, 1999). Neste sentido, o estresse oxidativo é hoje considerado como o principal fator etiogênico da DP (GERLACH & RIEDERER, 1996).

Embora a administração sistêmica de MPTP não acarrete em anormalidades na região nigroestriatal em ratos, a infusão direta de MPTP na Substância Negra destrói a zona compacta dos neurônios dopaminérgicos e depleta a dopamina estriatal e seus metabólitos (KALARIA *et al.*, 1987). Além disto, a administração de MPTP na SNc foi validada como um modelo animal de Parkinson, pois os animais tratados com esta neurotoxina apresentaram prejuízo na aquisição e retenção da memória (MIYOSHI, 1999). Segundo VALLDEORIOLA *et al.* (1997), as alterações cognitivas encontradas nos pacientes com DP envolvem lentidão no processamento de informações e prejuízo na aquisição das memórias de curto prazo. Tanto a memória operacional como a de longo prazo podem estar alteradas nos pacientes com DP (DUBOIS & PILLON, 1997).

Na esQUIVA ativa foram avaliados o número de esQUIVAS e os cruzamentos interprovas (CIP). O número de esQUIVAS é um parâmetro indicativo que o animal associou o som da campainha à liberação do choque, pois emite um comportamento de fuga condicionado ao estímulo (campainha). Os animais tratados com o MPTP apresentaram significativa redução deste parâmetro em comparação aos ratos dos grupos SHAM e controle como ilustra a Figura 2. Este fato indica que, a lesão com MPTP causou um prejuízo tanto na aquisição quanto na retenção da memória. Por outro lado, o tratamento com esta neurotoxina não alterou os CIP, como mostra a Figura 3, sugerindo que a

atividade motora exploratória dos animais não foi comprometida pela administração de MPTP. Corroborando os resultados apresentados por SCHNEIDER & POPE-COLEMAN (1995), FAGLIONI *et al.* (1997) e DUBOIS & PILLON (1997). Finalmente, o tratamento com PS não modificou estes parâmetros estudados, tanto nos animais controle como naqueles tratados com MPTP.

Tomados em conjunto, os dados acima apontam para uma hipótese alternativa para explicar a ausência de efeitos da PS no paradigma de memória empregado no presente trabalho.

De fato, quando uma droga que induz amnésia é administrada logo após a sessão de treino da esQUIVA passiva, pode-se avaliar o processo de consolidação da memória (onde a memória lábil é transformada em traço de memória estável), enquanto na esQUIVA ativa verifica-se a aquisição e retenção (SAHGAL, 1993). Deste modo, a PS foi capaz de reverter a amnésia induzida por reserpina na esQUIVA passiva conforme descrito por ALVES *et al.* (2000), mas não na esQUIVA ativa.

O efeito da PS no aprendizado e memória são bem conhecidos e alguns autores tem demonstrado que os efeitos da PS em estudos comportamentais e neuroquímicos são relacionados às funções cognitivas. ZANOTTI e colaboradores em 1989, verificaram que o tratamento crônico com PS (50 mg/dia/durante 7-12 semanas) em ratos idosos produz uma melhor performance no labirinto aquático de Morris e na esQUIVA passiva, ou seja, uma melhora na memória espacial e inibitória respectivamente. Além disto, DRAGO *et al.* (1981) demonstraram que a administração de PS i.p. (5,10 e 20 mg/kg) ou i.c.v. (5,10 e 20mg/2µl) facilitou a aquisição da memória na esQUIVA ativa. Estes resultados mostram que a PS melhora o aprendizado e a memória em ratos velhos e sugerem que a PS esteja envolvida com o processo de aquisição da memória. Em adição, ZANOTTI *et al.* (1986) e CLARO *et al.* (1999) verificaram o efeito da PS na

reversão da amnésia induzida por escopolamina, em ratos adultos testados na tarefa de esquiiva passiva e na tarefa de esquiiva discriminativa em um labirinto em cruz elevado. Estes dados indicam que a PS foi capaz de reverter prejuízos cognitivos em diversas tarefas, envolvendo diferentes tipos de memória, como a de longa duração e memória espacial.

Finalmente, a terceira hipótese está relacionada com o esquema de tratamento empregado. No presente trabalho, a PS foi administrada prolongadamente (7 dias), somente 14 dias após a cirurgia. É possível que neste intervalo, entre a cirurgia e o início do tratamento, as alterações no sistema dopaminérgico sejam irreversíveis, provocando um prejuízo permanente na memória de longa duração dos animais. Neste sentido, FAGIOLI *et al.* (1989), avaliaram o efeito da PS durante o período perinatal em camundongos C57BL/6. Os animais que receberam a PS no período de lactação (trinta dias) apresentaram um aumento significativo na retenção na esquiiva passiva em comparação aos animais do grupo controle. Sugerindo que este composto restaurou a memória de animais adultos quando administrada durante o período perinatal. Além disto, AMMASSARI-TEULE e colaboradores em 1989, avaliaram camundongos C57BL/6 que receberam PS desde o período de desenvolvimento pós natal até completarem 2 meses de idade em um labirinto radial. Foi verificado que animais tratados com PS apresentaram uma melhora na memória espacial comparando com o grupo controle.

Estes resultados mostram que a PS é capaz de atenuar os processos degenerativos associados às demências, bem como, mostra um efeito neuroprotetor durante o desenvolvimento cerebral.

Em conclusão, nossos resultados reforçam a idéia de que os sintomas cognitivos presentes no modelo animal do MPTP são similares àqueles encontrados nas fases

iniciais da DP e precedem as alterações motoras, assim confirmando sua utilidade como um modelo animal para o estudo da amnésia associada à doença de Parkinson. Por outro lado, a PS uma droga nootrópica, amplamente empregada no tratamento de demências não foi eficaz na reversão da amnésia induzida por esta toxina. Futuros experimentos poderão ajudar a elucidar estas questões.

VI – CONCLUSÕES

- A administração de MPTP na SNc provocou redução no número de esquivas em
- comparação aos grupos SHAM e controle, indicando prejuízo na aquisição e retenção da memória dos animais tratados com esta neurotoxina.
- A administração de MPTP não alterou o CIP, em comparação aos ratos dos grupos SHAM e controle. Este fato indica que a atividade motora exploratória não foi alterada pelo tratamento com MPTP.
- O tratamento com PS não reverteu a amnésia induzida pelo MPTP no pareamento número de esquivas, e não alterou o CIP, indicando que a atividade locomotora exploratória não foi alterado neste tratamento.

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARSAND, D.; LARSEN, J.P.; LIM, N.G.; JANVIN, C.; KARLSEN, K;
TANDBERG, E.; CUMMINGS, J.L. Range of neuropsychiatric disturbances in
patients with Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosur. Psychiat.**, **67**: 492-496,
1999.
- ALVES, C.S.D.; ANDREATINI, R.; DA CUNHA, C.; TUFIK, S.; VITAL, M.A.B.F.
Phosphatidylserine reverses reserpine-induced amnesia. Submitted to *European J.
Pharmacology*.
- AMMASSARI-TEULE. M.; FAGIOLI, S.; MARITATI, M.; POPULIN, R.; PAVONE,
F. Chronic administration of phosphatidylserine during ontogeny enhances subject-
environment interactions and radial maze performance in C57BL/6 mice.
Psychology & Behavior, **47**: 755-760, 1990.
- BERGMAN, H.; FEINGOLD, A.; NINI, A.; RAZ, A.; SLOVIN, H.; ABELES, M.;
VAADIA, E.. Physiological aspects of information processing in the basal ganglia
of normal and parkinsonian primates. **Trends neurosci.**, **21**: 32-38, 1998
- BRAAK, H.; BRAAK, E.; YILMAZER, D.; DEVOS, R.^{AI}; JANSEN, E.N.H.; BOHL,
J.. Pattern of brain destruction in parkinsons and alzheimer diseases. **J.Neural.
Transm.** **103**: 455-490.
- CALDERINI, G.; APORTI, F.; BELLINI, F.; BONETTI, A.C.; RUBINI, R.;
TEOLATO, S.; XU, C.; ZANOTTI, A.; TOFFANO, G. Phospholipids as
pharmacological tools in the aging brain. In: HORROCKS, L.A.; KANFER, J.N.;
PORCELLATI, G. (eds). **Phospholipids in the nervous system**, vol. 2.
Physiological roles. Raven Press, New York, 1985. pp 11- 19.

- CARLSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T.; WALDECK, B.(1958) On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. **Science**, **127**: 471.
- CLARO, F. T.; SILVA, R. H.; FRUSSA-FILHO, R. Bovine brain phosphatidylserina attenuates scopolamine-induced amnesia. **Physiology & Behavior**, vol. **67**, **4**: 551-554, 1999.
- COHEN, S.A.; MÜLLER, W.E. Age-related alterations of NMDA-receptor properties in the mouse forebrain: partial restoration by chronic phosphatidylserine treatment. **Brain Research**, **584**: 174-180, 1992.
- DRAGO, F.; CANONICO, P.L.; SCAPAGNINI, U. Behavioral effects of phosphatidylserine in aged rats. **Neurobiology of aging**, **2**: 209-213, 1981.
- DUBOIS, B.; PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **J. Neurol.**, **244**: 2-8, 1997.
- FAGIOLI, S.; CASTELLANO, C.; OLIVERIO, A.; PAVONE, F.; POPULIN, R.; TOFFANO, G. Phosphatidylserine administration during postnatal development improves memory in adult mice. **Neuroscience Letters**, **101**: 229-233, 1989.
- FAGLIONI, P.; BOTTI, C.; SCARPA, M.; FERRARI, V.; SAETTI, M.C. Learning and forgetting processes in Parkinson's disease: a model-based approach to disentangling storage, retention and retrieval contributions. **Neuropsychologia**, **35**: 767-779, 1997.
- FRICK, K. M.; BURLINGAME, L. A.; ARTERS, J. A.; BERGER-SWEENEY, J.. Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. **Neuroscience**, **95**: 293-307, 2000.
- GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **J. Neural. Transm.**, **103**: 987-1041, 1996.

- GIBB, W.R.G. Neuropathology in movement disorders. **J. Neurol. Neurosur. Psychiat., S: 55-67**, 1989.
- GOMEZ, B.; BÉDARD, P. J.. Effect of estrogen and progesterone on l-DOPA induced dyskinesia in MPTP-treated monkeys. **Neuroscience letters**, **135**: 129-132, 1992.
- GRONDIN, R.; TAHAR, A. H.; DOAN, V. D.; LADURE, P.; BÉDARD, P.J..
Noradrenoceptor antagonism with idozoxan improves l-DOPA-induced dyskinesias in MPTP monkeys. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** **361**: 181-186, 2000.
- HAGAN, J.J.; MIDDLEMISS, D.N.; SHARPE, P.C.; POSTE, G.H. Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. **TiPS**, **18**: 156-163, 1997.
- KALARIA, R.N.; MITCHELL, M.J.; HARIK, S. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**: 3521-3525, 1987.
- KORCZYN, A.D. Parkinson's disease. In: BLOOM, FE.; KUPFER, D.J. (eds.) **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**. Raven Press, New York, 1995, p. 1479-1484.
- LANGSTON, J.W.; FORNO, L.S.; ROBERT, C.S.; IRWIN, I. MPTP causes selective damage to the zona compacta of the substantia nigra to the squirrel monkey. **Brain Res**, **292**: 390-394, 1984.
- LINDNER, M.D.; CAIN, C.K.; PLONE, M.A.; FRYDEL, B.R.; BLANEY, T.J.; EMERICH, D.F.; HOANE, M.R. Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. **Behav. Brain Research**, **102**: 1-16, 1999.
- MAGGIONI, M.; PICOTTI, G. B.; BONDILOTTI, G.P.; PANERAI, A.; CENACCHI, T.; NOBILE, P.; BRAMBILLA, F. Effects of phosphatidylserine

therapy in geriatric patients with depressive disorders. **Acta Psychiatr. Scand** **81**: 265-270,1990.

MANTOVANI, P.; APORTI, F.; BONETTI, A.C.; PEPEU G. Effects of phosphatidylserine on brain cholinergic mechanisms. In: HORROCKS *et al.* (ed). **Phospholipids in the nervous system**, vol. 1. Metabolism. Raven Press, New York, 1982. pp 165-172.

MENZACHI, K.; WHELAN, K.T.; RISBROUGH, V.B.; RAO, T.D. and LLOYD, G. K.(1997). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280:393-401.

MIYOSHI, E. **Estudo das alterações de memória e motoras em animais que receberam MPTP na substância negra de ratos.** Curitiba-PR, 1999. Monografia (Especialização de Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NEISEWANDER, J.L.; CASTANEDA, E. and DAVIS, D.A. (1994). Dose-dependent differences in the development of reserpine-induced oral dyskinesia in rats: support for a model of tardive dyskinesia. *Psychopharmacology*, 116:79-84.

NUNZI, M.G.; MILAN,F.; GUIDOLIN, D.; POLATO, P.; TOFFANO, G. Morphological alterations of cholinergic basas forebrain neurons and spatial memory loss in aged rats: effects os phosphatidylserine administration. In: KEWITZ, THOMSEN, BICKEL (eds). **Pharmacological Interventions on Central Cholinergic Mechanisms in Senile Dementia (Alzheimer's Disease)**. W. Zuckschwerdt Verlag München, San Francisco, 1989. pp 148-152.

PEDATA, F.; GIOVANNELLI, L.; SPIGNOLI, G.; GIOVANNINI, M.G.; PEPEU, G. Phosphatidylserine increases acetylcholine release from cortical slices in aged rats. **Neurobiology of aging**, **6**: 337-339, 1985.

- RIEKKINEN, M.; JÄKÄLÄ, P.; KEJONEN, K.; RIEKKINEN JR, P. The α_2 agonist, clonidine, improves spatial working memory performance in Parkinson's disease. **Neuroscienc.**, **92**: 983-989, 1999.
- SAHGAL, A., 1993. Passive avoidance procedures. In: Sahgal. A. (Ed.), Behavioural Neuroscience: a practical approach. vol. I, Oxford University Press, Oxford, pp. 49-79.
- SAMSON, J.N.; The biological basis of phosphatidylserine pharmacology. **Clin. Trials J.** **24**:1-8;1987.
- SCHNEIDER, J.S.; POPECOLEMAN, A. Cognitive deficits precede motor deficits in a slowly progressing model of parkinsonism in the monkey. **Neurodegeneration**, **4**: 245-255, 1995.
- STEBBINS, G. T.; GABRIELI, J. D. E.; MASCIARI, F.;MONTI.; GOETZ, C. G.. Delayed recognition memory in Parkinson's disease: a role for working memory? **Neuropsychologia**, **37**: 503-510,1999.
- STOOF, J.C.; *et al.* Leads for the development of neuroprotective treatment in Parkinson's disease and brain imaging methods for estimating treatment efficacy. **European Journal of Pharmacology**, **375**: 75-86, 1999.
- TACHIBANA, H.; MIYATA, Y.; TAKEDA, M.; SUGITA, M.; OKITA, T. Event-related potencial reveal memory deficits in Parkinson's disease. **Brain Research**, **8**: 165-172. 1999.
- TEIVE, H.A.G.; MENESES, M.S. **Doença de parkinson – aspectos clínicos e cirúrgicos.** Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1996. pp 37-43.
- VALLDEORIOLA, F.; NOBBE, F.A.; TOLOSA, E. Treatment of behavioural disturbances in Parkinson's disease. **Neural Transm.**, **51**: 175-204. 1997.

ZANOTTI, A.; VALZELLI, L.; TOFFANO, G. Chronic phosphatidylserine treatment improves spatial memory and passive avoidance in aged rats. **Psychopharmacology**, **99**: 316-321, 1999.

ZIGMOND, M. J.; STRICKER, E. M. Recovery of feeding and drinking by rats after intraventricular 6-hydroxydopamine or lateral hypothalamic lesion. **Science**, **182**: 717-719, 1977.

WONG, S.S.; LI, R.H.Y.; STADLIN, A. Oxidative stress induced by MPTP and MPP⁺: selective vulnerability of cultured mouse astrocytes. **Brain Research**, **836**: 237-244, 1999.

Tabela 1. Efeitos da administração repetida (7dias) de PS no número de esquivas da sessão treino e teste de ratos após a administração de MPTP na SNc. Os valores estão representados pelas médias \pm EPM. ANOVA seguido do teste de Duncan.

GRUPOS	CONT+ salina	CONT + PS	SHAM + salina	SHAM + PS	MPTP + salina	MPTP + PS
TREINO	6,6 \pm 2,13	10,2 \pm 1,29	9,3 \pm 1,58	8,2 \pm 1,22	4 \pm 1,07	4,1 \pm 1,47
TESTE	15,2 \pm 3,12	14,6 \pm 3,02	15,4 \pm 2,7	15,7 \pm 2,32	6,3 \pm 0,97	5,3 \pm 1,07

Tabela 2. Efeitos da administração repetida (7dias) de PS no cruzamento inter provas da sessão treino e teste de ratos após a administração de MPTP na SNc. Os valores estão representados pelas médias \pm EPM. ANOVA seguido do teste de Duncan.

GRUPOS	CONT+ salina	CONT + PS	SHAM + salina	SHAM + PS	MPTP + salina	MPTP + PS
TREINO	23,8 \pm 4,83	19,3 \pm 2,25	18,2 \pm 4,22	21,4 \pm 2,71	23,6 \pm 4,04	24,7 \pm 4,77
TESTE	21,5 \pm 6,11	23,1 \pm 3,16	18,2 \pm 1,92	22,3 \pm 3,3	16,7 \pm 2,51	26,8 \pm 6,86